MYCOZIDE EFFEKTE SIMULIERTER KETOCONAZOL-KANTHARIDINBLASENFLÜSSIGKEITSSPIEGELVERLÄUFE GEGENÜBER CANDIDA ALBICANS IN VITRO

ULRIKE SCHLAF-MAIER

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0085

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Mycozide Effekte simulierter Ketoconazol-Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegelverläufe gegenüber Candida albicans in vitro

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von:
Ulrike Schlaf-Maier
aus Tittmoning
München 1986

Berichterstatter: PD Dr. med. h. c. Korting

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. h. c. O. Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 1987

Meinen Eltern in
Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
1.1. Ketoconazol-Entwicklung und Wirkungsweise
1.2. In-vitro- und In-vivo-Aktivität
1.3. Problematik der Korrelation zwischen in-vitro und in-vivo Wirkung und Möglichkeiten zur Lösung

2. Material und Methoden
2.1. Hefestamm: Candida albicans
2.2. MHK-Bestimmung von Candida albicans gegen Ketoconazol
2.3. Kulturmedien für unterschiedliche Wachstumsformen
2.4. Simultierte Gewebsspiegel von Ketoconazol
2.5. Modellapparat und Untersuchungsgang
2.6. Keimzählung
2.7. Antimykotikum-Konzentrationsbestimmungen
2.8. Morphologische Begleituntersuchung

3. Ergebnisse
3.1. Wachstum der eingesetzten Hefe in unterschiedlichen Medien
3.2. Wachstumshemmung im Sabouraud-Glukose-Medium
3.3. Wachstumshemmung im synthetischen Aminosäure-haltigen Medium
3.4. Tatsächliche Konzentrations-Zeit-Verläufe

4. Diskussion
4.1. Unterschiedliche Wirksamkeit von Ketoconazol auf Hefe- bzw. Pseudomycelformen
4.2. Verbesserte Aussagekraft über die klinische Wirksamkeit von Azolen aufgrund von In-vitro-Versuchen
4.3. Unterschiedliche Wirksamkeit von Ketoconazol bei Profilen der freien- bzw. Gesamtkonzentration in Kantharidin-Blasenflüssigkeit

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Danksagung

8. Lebenslauf

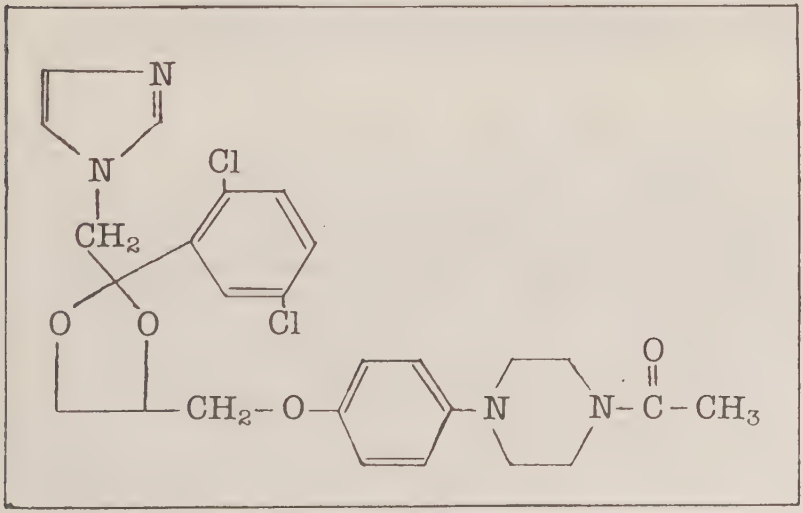
1. Einleitung

1.1. Ketoconazol – Entwicklung und Wirkungsweise

Untersuchungen über die Wirksamkeit von Imidazolen zeigten schon vor über 30 Jahren ihre Hemmung vom Bakterien- und Pilzwachstum (73). Damals wurde dieses Phänomen als kompetitive Hemmung zwischen dem Chemotherapeutikum (Benzimidazole) und Adenin und Guanin wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit erklärt. Die Erkenntnis, daß das Anfügen oder Verändern von Substituenten am Benzimidazol dessen Eigenschaften grundlegend verändern konnte (27), brachte in den folgenden Jahrzehnten eine Vielzahl neuer Azolderivate hervor (19, 25), die vorzugsweise als örtliche Antimykotika anzuwenden waren. Als erste, auch noch peroral aktive Verbindung (65) vermeidet Ketoconazol die kosmetischen Nachteile und Anwendungsprobleme der früheren Antimykotika, bei bislang meist nur sehr geringen Nebenwirkungen. Durch das breite Wirkungsspektrum (5, 69) erlangte Ketoconazol einen hohen Stellenwert in der antimykotischen Therapie.

Wir wissen, daß für die antimykotische Wirksamkeit
a) der unsubstituierte Imidazol-Ring
b) die N-C-Verknüpfung zwischen Imidazol-Ring und Restmolekül essentiell sind (51), während die Substituenten in weiten Grenzen variierbar bleiben und weniger die antimykotischen als vielmehr die pharmakokinetischen Eigenschaften verändern (Abb. 1).

Abb. 1: Strukturformel Ketoconazol



Morphologisch zeigen geringe Dosen (10-100 μg/ml) eigentumliche Veranderungen der zytoplasmatische Membran, die sonst glatte Oberflache von Candida albicans wirkt runzelig und zeigt wahllos verteilte Keimnarben Die vergroßerten Zellen konnen sich nach normaler Auskeimung und Teilung nicht trennen. Höhere Dosen (0,5-50 μg/ml) erzeugen eine Entartung aller subzellulären Organellen, und durch den Verlust der osmotischen Widerstandsfahigkeit verlieren die Zellen nun ihre kugelige Gestalt und gehen schließlich zugrunde (14,15).

Der biochemische Wirkungsmechanismus der Azolabkommlinge ist ausfuhrlich erforscht. Die strukturelle Integritat und Permeabilitat aller Zellmembranen ist weitgehend von Lipiden bestimmt (11, 39), wobei bei Candida albicans zwei Arten eine wesentliche Rolle spielen, nämlich Ergosterol und die Phospholipide.

Sowohl die morphologischen Veranderungen, als auch die Veranderung der Membranpermeabilitat konnten, wenigstens zum Teil, Ergebnis der Blockade der Ergosterolsynthese durch Ketoconazol sein (69). Bei allen Hemmstudien dieser Richtung zeigte sich zum Ausgleich eine Akkumulation von Ergosterol-Vorstufen-Sterolen mit einer C14-Methylgruppe, die aber, wie Lanosterol, nicht in der Lage sind, Ergosterol zu ersetzen (40, 44) Fur Miconazol wurde ein Einfluß auf die freien und veresterten Phospholipide nachgewiesen. Es erniedrigt den Anteil an ungesattigten Fettsauren, was sich negativ auf den Membranfluß und das Wachstum auswirkt (74) Auch die Aktivitat einiger membrangebundener Enzyme scheint beeinflußt Zytochrom C-peroxidase wird blockiert (7), die Kataloseaktivitat als Abwehrreaktion zur Erhaltung niedriger intrazellularer Peroxydspiegel vermindert. Zu beweisen bleibt der Zusammenhang dieser Beobachtungen mit dem intrazellularen Aufbau von Wasserstoffperoxid, der bei Behandlung mit Imidazolen beobachtet wird und damit zum Zelldruck beitragt. Eine Reihe von Imidazolen verursachten bei diesen in der Nahe der MHK (minimale Hemmkonzentration) und daruberliegenden Konzentration eine direkte Membranschadigung (1, 67).

Diese Effekte sind mit bemerkenswerten fungistatischen und fungiziden Ergebnissen in Verbindung gebracht worden (63, 64), wahrend doch die Wirkungen auf die Sterolsynthese in keiner Wechselwirkung mit der Wachstumshemmung zu stehen scheinen (55).

Interessanterweise zeigen gerade diejenigen Azole mit der geringsten Fahigkeit, die Membran direkt zu zerstoren, die starksten Schwankungen beim MHK-Test.

1.2. In-vitro- und In-vivo-Wirksamkeit

Die In-vitro-Testung eines Antimykotikums gibt daruber Aufschluß, ob eine Substanz die Entwicklung eines Pilzes schwach, maßig oder stark beeintrachtigt, wenn etwa zur Erzielung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) 100-10 μg/ml oder nur Konzentrationen von 1μg/ml und darunter benotigt werden. Ob das fehlende Wachstum mit einer Hemmung oder einer Abtotung gleichzusetzen ist, muß in einem weiteren Schritt uber Subkulturen ermittelt werden (36). Die Resistenzbestimmung kann vor allem drei Aufgaben erfullen:

- sie kann den wahrscheinlichen Therapieverlauf individueller Patienten vorhersagen,
- sie kann das therapeutische Potential von neu entdeckten Chemotherapeutika aufdecken und
- sie kann die Entwicklung einer Resistenz dokumentieren

Dabei lassen sich nicht alle Vorteile der bakteriellen Testung auf andere Mikroorganismen wie Pilze ubertragen Pilze sind im Gegensatz zu Baktieren eukaryontische Mikroorganismen. Sie besitzen alle einen echten Zellkern, in dem die DNS in echten Chromosomen lokalisiert ist Die Empfindlichkeit oder die Resistenz gegenuber bestimmten Substanzen ist somit zumindest fast durchwegs chromosomal festgelegt. Veränderungen können im wesentlichen nur durch Mutationen entstehen. Bei einer natürlichen Mutationsrate von 10^{-12} ist ihre Beobachtung in einer uberschaubaren Zeit moglich, aber wegen des langsamen Wachstums von Pilzen im Vergleich zu Bakterien viel seltener.

Pilze behalten daher mit einer wesentlich höheren Konstanz als Bakterien ihre charakteristische Empfindlichkeit und Widerstandsfähigkeit. Einfach ausgedruckt besagt dies, daß die einmal ermittelte MHK eines ausreichend großen Pilzkollektives eine relativ verläßliche Größe darstellen sollte, nach der man die therapeutische Dosis ausrichten kann (36).

Trotzdem ergibt sich in der Praxis aber gerade mit pathogenen Candida-Arten das Problem einer erheblichen Schwankungsbreite (0,02-80 μg/ml) der bisher veroffentlichten MHK-Werte von Ketokonazol (5, 10, 18, 21, 24, 26, 42, 47), was immer wieder zu neuen Überlegungen Anlaß gab (50).

Die Hauptursachen scheinen in Unterschieden im pH-Wert (41) und in der Zusammensetzung der verwendeten Nahrmedien zu liegen (24, 46), ebenso in der Inocolumgröße (10, 18, 46) und in der Bebrütungszeit (30, 41, 46).

Zusätzlich belastend wirkt sich eine gerade für Ketoconazol gegen Candida albicans ermittelte sigmoide Dosiswirkungskurve aus (2), die eine partielle Inhibition (17, 48) über einen weiten Bereich aufzeigt und es schwierig macht, einen klaren MHK-Endpunkt zwischen ungehindertem und vollgehemmten Wachstum zu bestimmen.

Im Gegensatz dazu steht die ausgezeichnete Wirksamkeit bei Tierversuchsmodellen (24, 38, 47, 66).

Die klinischen Erfahrungen mit Ketoconazol sind sehr ermutigend und zeigen, daß dieser Arzneistoff ein Schritt vorwärts in der Behandlung von Dermatomykosen (71), Mundsoor (5), Vaginal-Candidosen (3, 13) und anderen oberflachlichen Pilzerkrankungen darstellt.

Aber auch bei tiefen Mykosen wie der Systemcandidose zeigten sich bemerkenswerte Remissionen (5), so daß Ketoconazol als erstes oral einsetzbares Antimykotikum der Azolreihe in den letzten Jahren einen hohen Stellenwert in der antimykotischen Therapie erlangt hat.

1.3. Problematik der Korrelation zwischen In-vitro- und In-vivo-Wirkung und Möglichkeiten ihrer Lösung

Aus jahrelanger experimentieller Erfahrung mit antimykotisch wirksamen Azol-Derivaten sind Diskrepanzen zwischen In-vitro- und In-vivo-Wirkungen bei diesen Wirkstoffen bekannt. Immer wieder findet man Imidazol-Derivate, deren In-vitro-Wirkung, z.B. gegen Candida albicans, sich mit MHK-Werten von 32- 64 μg/ml als sehr schwach darstellt, die aber bei oraler oder parenteraler Applikation von Tagesdosen zwischen 25 und 100 mg/kg Korpergewicht bei Candida albicans-infizierten Mausen eine gute infektprotektive Wirksamkeit zeigen. Dabei liegen die mikrobiologisch wirksamen Serumkonzentrationen meist zwischen 2,5 und 10 μg/ml, also deutlich unterhalb der Keim-MHK-Werte in vitro. Die naheliegende Erklarungsmöglichkeit, daß im Makroorganismus antimykotisch starker wirksame Metaboliten der Wirkstoffe entstehen, konnte bei einigen der näher untersuchten Azolderivate durch Dunnschichtchromatographie ausgeschlossen werden. So ist es nicht verwunderlich, daß Arbeiten, die teilweise eine Korrelation zwischen der Höhe der MHK-Werte von Azolen bei Candida albicans in vitro und dem Therapieerfolg in vivo aufzeigen, bis heute uberaus rar geblieben sind (59, 62), wahrend sonst oft enorme Unterschiede der In-vitro- und In-vivo-Wirkung beschrieben werden (23, 47, 52, 53).

Bei einer direkten Untersuchung des Problems kam man zu dem Ergebnis, daß die In-vitro-Messungen der Keim-MHK als auch der Pharmakokinetikdaten und eine Korrelation beider Meßwerte für eine Aussage zur In-vitro-Wirksamkeit beim Ablauf einer

Mausecandidose nicht ausreichend prädikativ seien, da die mikrobiologische Fehlerrate 20% betragen hatte (52).

Ein ähnlich enttauschendes Ergebnis zeigte eine spatere Arbeit (53), die zwar fur Candida albicans Serotyp B eine signifikant bessere, insgesamt jedoch sehr geringe Korrelation brachte. So sind auch die Herstellerfirmen der verschiedenen Azol-Derivate davon abgekommen, sich bei der Suche nach neuen, erfolgversprechenden Azolen auf In-vitro-Testungen zu verlassen

Losungsmoglichkeiten

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Entwicklung einer standardisierten In-vitro-Testmethode fur Azole, die sich aber an der In-vivo-Wirksamkeit der Präparate orientieren muß.

Agar-Diffusion-Sensibilitatsteste wurden mehrfach versucht (12), obwohl dies gewohnlich erst vor dem Hintergrund eines hinreichend etablierten Agar-Dilutions-Testes erfolgen sollte. Es zeigte sich, daß die Ergebnisse der Diffusionsteste und der Dilutionsteste nicht unbedingt ubereinstimmen (60).

Eine weitere Alternative zur herkömmlichen MHK-Testung stellte die Verwendung von Nahrmedien dar, die das Pseudomycelwachstum stimulieren (54), da dies besser die In-vivo-Situation widerspiegelt (6) und deshalb eine bessere Vorhersage ermoglichen konnte. Untersuchungen dieser Art (45, 68) zeigen, daß insgesamt die Wirkung von Imidazolen auf die invasiven Formen von Candida albicans doch bedeutend starker ist als auf die Hefeformen.

Einige Laboratorien haben Empfindlichkeitsbestimmungen wahrend der exponentiellen Phase des Pilzwachstums entwickelt: Diese sind naturlich rascher abzulesen als die gewohnlichen 48 Stunden-MHK-Werte, aber sie sind wahrscheinlich zu kompliziert in Ausrustung und technischer Handhabung, um im Routinegebrauch angenommen zu werden Beispiele hierfur sind der IC50-Test (18), der Trubheitsbestimmungen der antimykotischen Konzentration, die 50% Wachstumshemmung erzeugt, mit einer wirkstoffreien Kontrolle vergleicht, und die Messung der Flache unter der Dosis-Antwortkurve zwischen fixen oberen und unteren Konzentrationsgrenzen im „relative-inhibition-factor" Test (49). Diese beiden Methoden haben den Vorteil gegenuber normalen MHK-Bestimmungen, daß sie den besonderen inhibitorischen Effekten der Azol- Antimykotika Rechnung tragen.

Gegenstand ausfuhrlicher Untersuchungen von Rumler und Heins war der Einfluß der Kontaktzeit auf die Hemmwirkung von Imidazolen, die damit auf die fehlende Dynamik bei den gängigen Methoden der Sensibilitätstestung hinweisen (57, 58). Es erscheint aber nicht nur fur die systemische, sondern auch fur die Lokaltherapie wichtig zu wissen, wie lange ein bestimmtes Chemotherapeutikum einwirken muß, um das konzentrationsabhangige Wirkungsmaximum zu erreichen.

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung des prädikativen Wertes von In-vitro-Untersuchungen mit Ketoconazol bei Candida albicans konnte deshalb darin bestehen, nicht die antimikrobiellen Effekte konstanter, sondern vielmehr – wie in Wirklichkeit bei der Therapie – ständig schwankender Wirkstoffkonzentrationen zu untersuchen, wie dies erstmals Grasso et al. (20) bei Bakterien vorgeschlagen haben, und wie es erst kurzlich mit anderen Erregern (31, 32, 33) von einer Arbeitsgruppe der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt worden ist.

Da es sich bei Candida-Infektionen meist um Haut- oder Schleimheitinfektionen, und nicht um septische Erkrankungen handelt, erscheint es besonders sinnvoll, dabei Hautspiegelverlaufe und nicht Plasmaspiegelverlaufe zugrunde zu legen Derartige Daten wurden kurzlich von Schafer-Korting et al. mitgeteilt (61).

2. Material und Methoden

2.1. Hefestamm: Candida albicans

Diese Art kann beim Menschen sowohl saphrophytär (Mundschleimhaut der Säuglinge, Vaginalschleimhaut schwangerer Frauen) als auch unter bestimmten Umständen parasitär vorkommen (Soormykose, etc.).

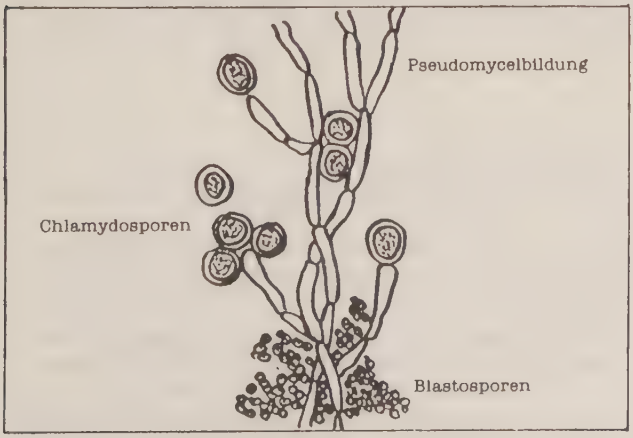
Als Keim wurde ein rezentes klinisches Isolat von Candida albicans (Nr.5125/85) aus der Mundhöhle gewählt, dessen Spezieszugehörigkeit noch einmal eingehend anhand folgender Kriterien überprüft wurde:

1. Koloniemorphologie
Es fanden sich glatte, flache bis leicht gewölbte Kolonien von weißem bis eierschalenfarbenem Aussehen. Des öfteren auch Pseudomycel, das in den Agar wächst.

2. Keimschlauchbildung im Poolserum
Sehr typisch für Candida albicans, da außer dieser nur noch die seltene Candida stellatoidea diese Keimschläuche bildet (70). In mit ca. 0,5 ml Poolserum gefüllte Eppendorf-Reaktionsgefäße wird eine Kolonie eingerührt und ca. 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Danach hat ein bestimmter Prozentsatz von Candida albicans die charakteristischen Keimschläuche gebildet.

3. Chlamydosporenbildung auf Reisagar
Die von dem Kulturpraparat gezeigte Bildung von Hüllensporen (Mantelsporen), die sich rundlich oder oval, dickwandig und doppelt konturiert darstellen, sogenannte Chlamydosporen (Abb. 2), entwickelt Candida albicans unter Mangelbedingungen, wie sie z B. Reisagar bietet (16). Auch diese Bildung ist sehr spezifisch für Candida albicans, da sie sonst nur noch bei Candida stellatoidea vorkommt.

Abb. 2: Morphologie von Candida albicans auf Reisagar
(Chlamydosporenbildung), Schemazeichnung



4. Typische biochemische Leistungen
Mit Hilfe eines standardisierten Verfahrens auf Uni-Yeast-Tek-TM-Platten (Flow Laboratories, Meckenheim, D; 8, 9) konnten wichtige biochemische Leistungen geprüft werden, wobei besonders die positive Rohrzucker-Assimilation wichtig zur Differenzierung von Candida stellatoidea war, da sie diese Fähigkeiten nicht besitzt.

Insgesamt bleibt hier zu beachten, daß das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines einzigen morphologischen Merkmals, z.B. Keimschlauch- oder Chlamydosporenbildung, für die rasche mutmaßliche Identifizierung nützlich ist, es aber trotzdem erforderlich bleibt, das ganze Reaktionsmuster zu kennen, um die ermittelte Identität eines Hefestamms zu bestätigen.

Dieser Stamm wurde im Verfolg der weiteren Untersuchungen regelmäßig im Vier-Wochen-Abstand auf Schrägagar (Bakto-Sabouraud Dextrose-Agar, Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) subkultiviert.

2.2. MHK-Bestimmung von Ketoconazol gegenüber Candida albicans

Die In-vitro-Empfindlichkeit der Hefe wurde im Agardilutionstest untersucht und zwar im wesentlichen wie von Johnson et al. (28) beschrieben.
Petrischalen (9 cm Durchmesser), die das Nährmedium mit der entsprechend abgestuften Verdünnungsreihe von Ketoconazol-Lösungen enthielten, wurden in einem Multipointinoculator beimpft. Das Inoculum wurde auf 8×10^5 koloniebildende Einheiten pro ml eingestellt. Ketoconazol wurde ohne Einsatz von Serum in Lösung gebracht (1ml Dimethylformamid für 10 mg Ketoconazol), und auf unterschiedliche Konzentrationen gebracht. Die höchste getestete Arzneistoffkonzentration betrug 128 μg/ml. Das Antimykotikum wurde als Reinsubstanz vom Hersteller (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Als minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde diejenige niedrigste Konzentration angesehen, die gerade sichtbares Wachstum verhinderte. Die Ablesung erfolgte nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C. Unter diesen Voraussetzungen konnte die MHK dieses Candida albicans-Stammes mit 64 μg/ml ermittelt werden (34).

2.3. Kulturmedien

Für die Hauptversuche wurde zunächst Sabouraud-Dextrose-Bouillon (Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) verwendet, später statt dessen ein synthetisches Aminosäurehaltiges Flüssigmedium.
Das erstere erlaubt die Kultivierung von Candida albicans als fast reine Hefeform (morphologisch nur Blastosporen mit wenigen Prozent Pseudomycelbildung, 43) bei 37° C, während bei dieser Temperatur das letztgenannte Medium den Hefestamm zu einer fast ausschließlichen Pseudomycelbildung anregt (37).
Dieses sogenannte „LBC-synthetic medium" (benannt nach seinen Entdeckern Lee, Buckley und Campbell), wurde aufgrund des Amino-peptidasen- Leistungsprofils von Candida albicans entwickelt und zeigt die in Tab. 1 aufgeführte Zusammensetzung.

Diese Aminosäuren-Zucker Salz-Mischung wird in 1000 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Biotin wurde getrennt als Stammlösung hergestellt, membranfiltriert (Filter SM 16534K, Sartorius, Göttingen D) und dem abgekühlten Medium hinzugefügt.

Tab. 1 Zusammensetzung des synthetischen Aminosaure-Mediums nach Lee et al.

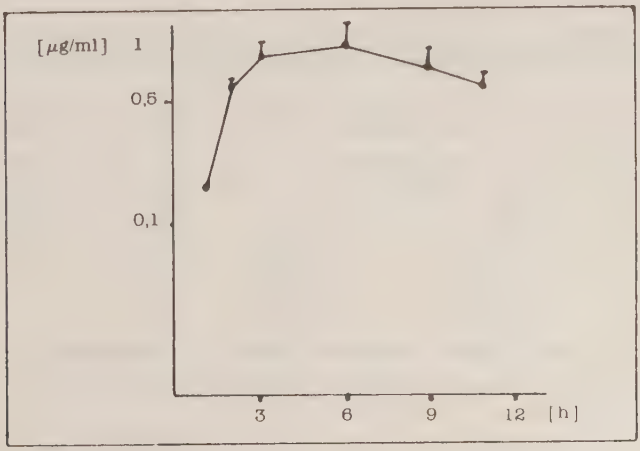
anorganische Salze:	$(NH_4)_2SO_4$	(Merck, Darmstadt, D)	5.0	(g/l)
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	(Merck, Darmstadt, D)	0,2	
	K_2HPO_4	(Merck, Darmstadt, D)	2,5	
	NaCl	(Merck, Darmstadt, D)	5,0	
D(+)-Glukose:		(Merck, Darmstadt, D)	12,5	
L-Aminosäuren:	Alanin	(Merck, Darmstadt, D)	0,5	
	Leucin	(Merck, Darmstadt, D)	1,3	
	Lysin	(Merck, Darmstadt, D)	1,0	
	Methionin	(Merck, Darmstadt, D)	0,1	
	Ornithin	(Merck, Darmstadt, D)	0,07	
	Phenylalanin	(Merck, Darmstadt, D)	0,5	
	Prolin	(Merck, Darmstadt, D)	0,5	
	Threonin	(Merck, Darmstadt, D)	0,5	
	d-Biotin	(Sigma, St. Louis, Mo., USA)	0,001	

2.4. Simulierte Gewebsspiegel

Der vorliegenden Untersuchung wurden Ketoconazol-Konzentrationen zugrunde gelegt, die bei gesunden Probanden nach einmaliger oraler Gabe von 200 mg in cutaner Kantharidin-Blasenflüssigkeit (CBF) gefunden worden waren (61).

Um diese zu gewinnen, werden fünf Kantharidinpflaster von 1 cm^2 (Bock, Gelsenkirchen, D) zehn Stunden vor Einnahme des Antimykotikums auf die Bauchhaut gelegt und mit Klebepflaster dort festgehalten. Die entstandenen Blasen wurden 1,2,3,6 und 9 Stunden nach Verabreichung des Arzneistoffese punktiert (jede Blase nur einmal). Ein weiteres Pflaster, das unmittelbar nach der Medikamentenaufnahme aufgeklebt wurde, lieferte schließlich noch die Blasenflüssigkeit nach 11 Stunden (Abb. 3).

Abb. 3: Ketoconazol-Konzentration (Mittelwert ± mittlere Standardabweichung) in Kantharidin-Blasenflüssigkeit beim Menschen nach einmaliger peroraler Gabe von 200 mg



Die Bestimmung der Ketoconazolproben erfolgte mit Hilfe eines gaschromatographischen Verfahrens, dessen Nachweisgrenze bei 0,01 μg/ml lag. Die so gewonnenen Daten wurden mit Hilfe eines modifizierten „RIP"-Programms pharmakokinetisch ausgewertet (22). Als Programmgrundlage diente dabei ein schon früher beschriebenes mathematisches Modell (siehe 2.5.) mit der Gleichung $C = A \cdot (e^{-K_e t} - e^{-K_a t})$ zur Simulation dieses zeitlichen Verlaufs der Ketoconazol-Konzentration (siehe Abb. 3), wobei als Ergebnis eines Programmdurchlaufs die Variablen der Gleichung so festgelegt werden, daß die damit berechnete Kurve bis auf geringe Abweichungen die gemessenen Mittelwerte berührt und somit die In-vivo-Situation mathematisch ausgezeichnet erfaßt wird.

Dieses Programm lieferte die Werte von A (modifizierte Anfangskonzentration), K_a (Absorptionskonstante), K_e (Eliminationskonstante), aus denen sich alle versuchsrelevanten Parameter errechnen lassen, außerdem t_{lag} (Zeitverzug der RIP-Kurve), notwendig zur Berechnung der Ketoconazol-Konzentration in der Zeit, siehe Tab. 3, sowie die Halbwertszeiten der Absorption ($T_{1/2a}$) und Elimination ($t_{1/2e}$).

Die RIP-Anpassung an CBF-Konzentrationen (gesamt) brachte folgendes Ergebnis:

$t_{lag} = 0.80$ $K_a = 0.3578$ $t_{1/2a} = 1.94$
$A = 3.80$ $K_e = 0.1661$ $t_{1/2e} = 4.17$

Daher lautet die Bateman-Funktion der Gesamtkonzentrationen in diesem Fall:

$C_G = 3.80\,(e^{0.1661\,t} - e^{0.3578\,t})$

Uneingeschränkt gilt dies aber nur bei einer hundertprozentigen Bioverfügbarkeit, die aber im vorliegenden Fall nicht gegeben ist. Die Konzentration an ungebundener Substanz in der Kantharidinblasenflüssigkeit (CBF) beträgt nur 2,3% der Gesamtkonzentration (fu = 0.023, Laut persönliche Mitteilung Dr.Schäfer-Korting), daraus ergibt sich als Bateman- Funktion der Konzentration an ungebundener Substanz in der CBF:

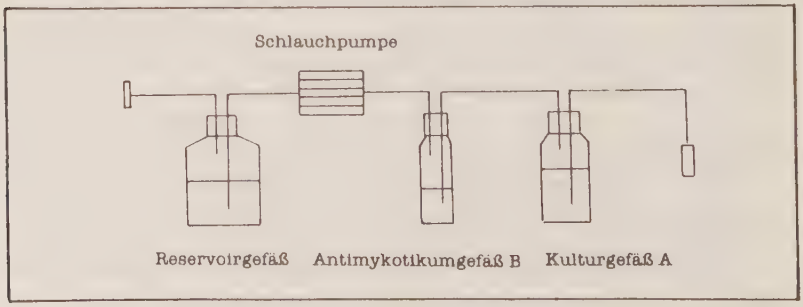
$C_F = 0.087 \cdot (e^{0.1661\,t} - e^{0.3578\,t})$

2.5. Modellapparat und Untersuchungsgang

Theoretische Grundlagen

Ein von Rowe und Morozowich (56) erstmals beschriebenes Modell zur Simulation von Absorptions-, Verteilungs- und Eliminationsprozessen auf mathematischer Basis wurde von Grasso et al. (20) weiter modifiziert (schematisch in Abb. 4 dargestellt) und dient in der vorliegenden Arbeit zum Studium von Gewebsflüssigkeitsspiegelprofilen (siehe auch 2.7.)

Abb. 4: Schema des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des antimikrobiellen Effekts von ständig schwankenden Ketoconazolkonzentrationen auf Candida albicans



Mit diesem modifizierten Modellapparat erhält man zwei aufeinanderfolgende Verteilungsabläufe erster Ordnung und kann dann in diesem offenen Einkompartmentmodell pharmakokinetische Prozesse simulieren, wie z.B. in diesem Fall das Anfluten der Ketoconazolkonzentration ins Gewebe nach der einmaligen oralen Gabe von 200 mg und natürlich auch die gleichzeitig einsetzende Elimination.

Die einzelnen Versuchsparameter, die Flußrate, die Volumina in den Gefäßen A und B wurden vor Versuchsbeginn aus den unter 2.4. genannten pharmakokinetischen Daten abgeleitet (vergleiche Tab.2).

Tab. 2 Versuchsrelevante Pharmakokinetikdaten und daraus abgeleitet experimentielle Großen

Parameter		
Absorbtionskonstante, K_a	:	0,3578 h^{-1}
Eliminationskonstante, K_e	:	0,1661 h^{-1}
Halbwertszeit der Absorption, $t_{1/2a}$	:	1,94 h
Halbwertszeit der Elimination, $t_{1/2e}$	:	4,17 h
Flußrate, F	:	3,0 ml/h
Volumen Kulturgefäß, V_A	:	180,61 ml
Volumen Antimykotikumgefäß, V_B	:	83,84 ml
Dosis, Gesamtkonzentration, D_G	:	0,3677 mg
Dosis, freie Konzentration, D_F	:	0,0084 mg

Der Zusammenhang von C (0) mit der Dosis und dem Volumen läßt sich nach Grasso (20) ganz allgemein folgendermaßen beschreiben:

$$C(0) = \frac{D}{V_A} \quad (I)$$

Ebenso lassen sich die Eleminations- bzw. Absorptionskonstanten mit der Flußrate und dem Volumen in Verbindung bringen:

$$K_E = \frac{F}{V_A} \quad (II) \qquad\qquad K_A = \frac{F}{V_B} \quad (III)$$

Dabei gilt es zu beachten, daß bei Versuchsbeginn, also von dem Moment des Einschaltens der peristaltischen Pumpe an, in dem Antimykotikumgefaß B die Wirkstoffkonzentration exponentiell zu sinken beginnt, der Gleichung $C(t) = C(0) \cdot e^{K_e t}$ folgend, wobei C (0) die Antimykotikumkonzentration zur Zeit t = 0 und K_e die Eliminationskonstante darstellt.

Durch diesen Eliminationsprozeß in V_B wird nun gleichzeitig eine Absorption im Kulturgefäß V_A ausgelöst und naturlich, wiederum gleichzeitig, eine erneute Elimination.

Deshalb wird sich die Antimykotikumkonzentration im Kulturgefäß V_A in der Zeit als Überlagerung dieser beiden Prozesse darstellen, die sich mathematisch auf folgende Weise beschreiben läßt:

$$C(t) = C(0) \cdot \frac{K_a}{K_a - K_e} \cdot (e^{K_a t} - e^{K_e t}) \quad (IV)$$

Berechnung der Volumina

Um einerseits den Totraum in den Gefaßen A und B moglichst gering zu halten (dadurch wird es moglich, daß sich der durch die Schlauchpumpe erzeugte Druck ohne großere Verzogerung fortpflanzen kann und somit der Druckanstieg in allen Gefaßen gleichzeitig erfolgt) und andererseits den Durchfluß so zu wahlen, daß trotz Keimausschwemmung aus dem Kulturgefaß A dort immer noch ein Wachstum der Restkultur gegeben war, wahlten wir eine Flußrate von 30 ml/h (= 0,5 ml/min).

Nach Umformung von (II) und (III) ergibt sich dann:

$$V_A = \frac{F}{K_e} = \frac{30\,[\mathrm{ml/h}]}{0{,}1661\,[\mathrm{h}^{-1}]} = 180{,}61\ \mathrm{ml}$$

$$V_B = \frac{F}{K_a} = \frac{30\,[\mathrm{ml/h}]}{0{,}3578\,[\mathrm{h}^{-1}]} = 83{,}84\ \mathrm{ml}$$

Die Bouillonmenge im Reservoirgefaß richtet sich nach Versuchsdauer und Flußrate: So sollten sich bei F = 30 ml/h und t = 8 h mindestens 240 ml + 30 ml Flussigkeit zum Fullen der Verbindungsteile + 30 ml Sicherheitsreserve (=300ml) über dem unteren Rand des im Reservoirgefaß befindlichen Glasrohres befinden.

Berechnung der Modellversuchsdosis

Zur Berechnung der Modellversuchsdosis benutzt man den vom RIP-Programm gelieferten Wert A der modifizierten Anfangskonzentration, der bereits in (IV) seine Anwendung gefunden hat:

$$A = C(0) \cdot \frac{K_a}{K_a - K_e} \qquad (V)$$

Wird in diesem Ausdruck C(0) aus (I) eingesetzt, so ergibt sich:

$$A = \frac{D}{V_a} \cdot \frac{K_a}{K_a - K_e}$$

Nach Auflosung dieser Gleichung nach D erhalt man dann die allgemeine Formel:

$$D = \frac{A\ V_A\ (K_a - K_e)}{K_a}$$

Daraus ergibt sich in diesem Fall mit den Daten aus dem unter 2.4. erwahnten RIP-Programm folgendes Ergebnis:

Dosis der Modellversuchsgesamtkonzentration:

$$D = 3{,}8\,[\mathrm{mg/l}] \cdot 180{,}61\,[\mathrm{ml}] \cdot (0{,}3578\,[\mathrm{h}^{-1}] - 0{,}1661\,[\mathrm{h}^{-1}]) : 0{,}3578\,[\mathrm{h}^{-1}] = 0{,}3677\ \mathrm{mg}$$

Dosis der freien (ungebundenen) Konzentration:

$$D = 0{,}087\,[\mathrm{mg/l}] \cdot 180{,}61\,[\mathrm{ml}] \cdot (0{,}3578\,[\mathrm{h}^{-1}] - 0{,}1661\,[\mathrm{h}^{-1}] : 0{,}3578\,[\mathrm{h}^{-1}] = 0{,}0084\ \mathrm{mg}$$

Versuchsvorbereitung

Schon vor Versuchsbeginn wurden alle im Hauptversuch verwendeten Gefäße mit den entsprechenden Bouillonmengen gefüllt und autoklaviert, ebenso die Verbindungsteile, Schlauchpumpenansätze und diverse Reagenzglaser (zur Inkubation, Verdunnungsreihe, Probenentnahme).
Nachfolgend die Materialliste zur Durchführung eines Hauptversuches:

1 Reservoirgefäß (Gaswaschflasche, Normschliff 29/32, 1000 ml, Normschliffgerätebau, Wertheim, D)
1 Kulturgefäß (Gaswaschflasche, Normschliff 29/32, 500 ml, Normschliffgerätebau, Wertheim, D)
1 Antimykotikumgefäß (Gaswaschflasche, Normschliff 29/32, 250 ml, Normschliffgerätebau, Wertheim, D)
1 Vielfach-Schlauchpumpe (Desaga, Modell 131 900, Heidelberg, D)
1 Plastikwanne (65 × 35 × 25 cm)
1 Heizgerät (Thermomix 1420, Braun, Melsungen, D)
2 Magnetmotoren (IKA MAG-RO Motor, IKA-Werk, Stauffen, D)
2 Magnetrührer (Länge 30 mm, 20 mm, IKA-Werk, Stauffen D)
1 Photometer (Spectronic 20, Bausch u.Lomb, Unterhaching, D)
1 Eppendorfpipette 200 µl (Eppendorf Geratebau Netheler + Hinz GmbH, Hamburg, D)
div. Eppendorfpipettenspitzen, blau (Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz GmbH, Hamburg, D)
Auslauf-Meßpipetten 2 ml
2–3 Inkubationsreagenzgläser (mit Flüssigmedium)
ca. 25 Reagenzgläser (leer)
ca. 70–80 Reagenzgläser (alugestöpselt, mit 1,8 ml Flüssigmedium)
div. Reagenzglasständer
70–80 Nachschuttreagenzglaser mit Aluverschluß (gefüllt mit Flussigmedium)
div. Glasgefäße
ca. 40 Petrischalen mit Nährboden (30ml Sabouraud-Dextrose-Agar, Difco, Detroit, Michigan, USA)
1 Petrimat (K & B Grubbs Instrument GmbH, Düsseldorf, D)
4–5 Verbindungsteile (sterilisierbare Silicon- oder Gummischlauche, div. Langen)
2 Schlauch-Verteiler (Best.-Nr. 132024 Desaga, Heidelberg, D)
1 Schlauchsatz C/6 (Best.-Nr. 131941, Desaga, Heidelberg, D)
div. Einmalspritzen, 2 ml und 10 ml (Inject Luer, Braun, Melsungen, D)
ca. 40 Filterpapierscheiben (SM 114007, Sartorius, Göttingen, D)
13–14 Mikrofilter (Filter SM 16534K, Sartorius, Göttingen, D)
1 Rüttler (Best.-Nr. 34524-200, Cenco instrumenten, Breda, Netherlands)
1 mechanisches Zählgerät (Colony-Counter, New Brunswick, Offenbach, D)
1 Präzisions-Brutschrank (Typ B-BKE, Memmert GmbH, Schwabach, D)
1 Autoklav (Aigner, Nr. 46-1HST-ED-L, München, D)
1 Gefriergerät (Modell KGE 3500, Bosch-Hausgerate GmbH, München, D)
1 Mikroskop (Leitz-Interferenz-Mikroskop, Wetzlar, D)
div. Deckgläser und Objekttrager
1 Platinöse
1 Meßzylinder, 250 ml (Hirschmann, EM techcolor, D)
1 Präzisionswaage (Sartorius, Typ 1712, Gottingen, D)
ca. 13–14 Eppendorf Reaktionsgefaße Typ 3810, 1,5 ml (Eppendorf Geratebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg, D)
1 Filtergerät (SM 16608, Sartorius, Gottingen, D)
1 Wasserstrahlpumpe
1 Pinzette
1 Stoppuhr
1 Bunsenbrenner

Versuchsaufbau

Zunachst wurde eine ausreichende Menge Aqua destillata in einer Plastikwanne mit Hilfe eines Umwalzheizgerates (siehe Liste) auf 37 C erwarmt, so daß auch das Flussigmedium der in der Wanne stehenden Gefaße (Reservoirgefaß, Antimykotikumgefaß und Kulturgefaß) ebenfalls diese Temperatur annehmen konnte.

Wahrenddessen erfolgte mit Hilfe einer Platinose die Beimpfung der Inkubationsreagenzglaser mit einer 24 36 Stunden alten Kultur von Candida albicans Nr 5125/85 Um eine reproduzierbare Anfangskonzentration zu erzielen, wurde die Dichte photometrisch bestimmt. Bei 540 nm und 10% Transmission zeigte sich so zum Zeitpunkt t=0 eine Keimdichte von ca. 10^6 koloniebildenden Einheiten pro ml. Der Inhalt der Inkubationsreagenzglaser wurde nun unter sterilen Verhaltnissen in das Kulturgefaß A eingebracht, und von einem Magnetruhrer (Magnetmotor unter der Wanne) bis zum Beginn des Versuchs standig bewegt. Der Vorlauf von drei Stunden diente zur Ausschaltung der Lag-Phase, d.h. der Zeit, die die Keime benotigten, um nach Umstellung auf das Flussigmedium zu einem exponentiellen Wachstum uberzugehen

In dieser Zeit erfolgte auch die Einwaage (Prazisionswaage siehe Liste) der benotigten Antimykotikummenge Bei der praktischen Durchfuhrung erwies es sich dabei als nutzlich, etwas mehr abzuwiegen, um bei der anschließenden Sterilfiltration (Filter siehe Liste) eine geringe Flussigkeitsreserve zu besitzen.

Die abgewogene Ketoconazol-Menge wurde mit Hilfe von speziellem Wagepapier in ein sterilisiertes Glasgefaß eingebracht, mit 1 ml N-N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, D) gelost und mit (x-1) ml Flussigmedium verdunnt Schließlich wurden 83,84 ml sterilfiltriert und in das Antimykotiumgefaß B eingebracht.

Etwas modifiziert erfolgte die Einwaage bei Versuchen mit der freien Konzentration an Ketoconazol. Hier wurde ca. die 10fache Menge abgewogen, wie oben beschrieben gelost und verdunnt. Folgende Gleichung diente dabei zur Ermittlung der Flussigkeitsmenge fur die richtige Konzentrationseinstellung:

$$\frac{\text{Einwaage in mg } (> 10\ D_F)}{10\ D_F\ (= 0{,}084\ \text{mg})} \cdot V_B\ (= 83{,}84\ \text{ml}) = x \quad \text{ml}$$

Von dieser Lösung wurden nun $^1/_{10}$ V_B (8,38 ml) in das Antimykotikumgefaß sterilfiltiert, wahrend $^9/_{10}$ V_B (75,45 ml) schon vor Sterilisation des Gefaßes eingebracht worden waren.

Auch das Antimykotikumgefaß B war mit einem Magnetruhrer versehen, um während des gesamten Versuchsablaufs eine uberall gleichmaßige Konzentrationsverteilung zu ermoglichen.

Beim Zusammensetzen des Systems stellte sich folgendes Vorgehen als zweckmaßig heraus Zunachst erfolgte das Anschließen eines Schlauchstuckes mit vorgeschaltetem Mikrofilter am Ansaugstutzen des Reservoirgefaßes R, danach das Anbringen der Verbindungsteile am Schlaucheinsatz, Einlegen des Schlaucheinsatzes in die Schlauchpumpe und Entluften dieses Teilsystems (Totraumverminderung), Anschließen der Pumpenableitung an das Gefaß B, Verbinden der Gefaße A + B und schließlich das Befestigen des ableitenden Glasrohrchens zum Probenentnahmezylinder.

Versuchsdurchführung:

Nach Einschalten der Schlauchpumpe zum Zeitpunkt t=0 wird aus dem Reservoirgefäß eine in der Zeiteinheit gleiche Menge Nährmedium in das Antimykotikumgefäß B eingebracht. In diesem befindet sich eine definierte Antimykotikummenge D, welche in dem Versuchsansatz der klinisch verabfolgten Dosis entspricht. Da es sich um ein geschlossenes System handelt, wird gleichzeitig eine entsprechende Menge Antimykotikum-haltige Flüssigkeit in das Kulturgefäß A weiterbefördert, wie dies aus der Schemazeichnung hervorgeht. In diesem Gefäß A befand sich zu Versuchsbeginn eine Suspension von sich rasch teilenden Hefezellen. Aufgrund des gleichen Drucks im Gesamtsystem wurde wiederum aus diesem, für das Gewebe stehende Gefäß mit dem Volumen V_A eine entsprechende Flüssigkeitsmenge nach außen in ein Probenentnahmegefäß entleert, was zu den verschiedenen Meßzeitpunkten die Analyse von Keimdichte (siehe 2.6) und Antimykotikumkonzentration (siehe 2.7) in dem zentralen Gefäß A erlaubte.

Jeder einzelne Teilversuch wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit doppelt ausgeführt. Im einzelnen wurden sowohl die Gesamt- als auch die freien (nicht eiweißgebundenen) Konzentrationen von Ketoconazol simuliert, und zwar einerseits in einem die Hefeform, und andererseits in einem die Pseudomycelform begünstigenden Medium (siehe 2.3.).

Zu Vergleichszwecken wurde bei jedem einzelnen Experiment ein Parallelversuch ohne Zugabe von Ketoconazol mitgeführt, um die Unabhängigkeit der Keimzahlverminderung von den dynamischen Versuchsbedingungen zu belegen.

2.6. Keimzählung

Zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wurde in einem Reagenzglas die aus dem Kulturgefäß A kommende Flüssigkeit ca. 2 Minuten lang aufgefangen (Untersuchungszeitpunkt ± 1 Minute), um eine Probenflüssigkeit von ca. 1 ml zu erhalten. Außerdem mußte im Auffangmeßzylinder die entsprechende Menge Aqua dest. nachgefüllt werden, um die Kontrolle über die Kontinuität der Fördermenge der peristaltischen Pumpe zu gewährleisten.

Um geeignete Verdünnungsreihen herstellen zu können, wurden vor Versuchsbeginn 1,8 ml der auch im Hauptversuch verwendeten Bouillon (Sabouraud Dextrose Broth bzw. LBC-Synthetic Medium) in Reagenzgläser pipettiert und mit Aluminium beschichteten Stopfen so verschlossen, daß während der Sterilisation der Flüssigkeitsverlust vernachlässigbar klein gehalten werden konnte. Von der gewonnenen Probe wurden nun 0,2 ml mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette in ein sterilisiertes, mit 1,8 ml Bouillon gefülltes Reagenzglas gebracht und maschinell durchmischt (Rüttler siehe Liste). Von dieser 1:10 Verdünnung der ursprünglichen Keimdichte wurden nun mit neuer Pipettenspitze wiederum 0,2 ml entnommen und in das nächste Reagenzglas gegeben. Die Anzahl der durchgeführten Verdünnungsschritte wurde so ausgerichtet, daß bei der später folgenden Auswertung die Keimzahl im zweistelligen Bereich lag.

Um die Ungenauigkeiten oder Verfälschungen durch Verunreinigungen möglichst gering zu halten, wurde jede Verdünnungsreihe doppelt angelegt. Die beiden jeweils letzten Teilproben wurden durch Filterpapierscheiben gesogen (Filter siehe Liste), welche anschließend auf Sabouraud Dextrose Agar aufgebracht und für 48 Stunden bei 37° C bebrütet wurden.

Die Bewertung erfolgte unter Zuhilfenahme eines mechanisierten Colony Counters (New Brunswick, Offenbach, D). Da somit für jeden einzelnen Meßzeitpunkt vier Keimzählungen durchgeführt wurden, stellt das graphisch dargestellte Ergebnis das Mittel der so gewonnenen Einzeldaten dar.

2.7. Antimykotikum-Konzentrationsbestimmung

Die Ketoconazolspiegel wurden im modifizierten Bioassay ermittelt (4, 29), soweit die Daten nicht die Untergrenze der Empfindlichkeit der Methode unterschritten (dies war bei den freien Konzentrationen der Fall). Dazu wurden die zu untersuchenden Proben, ebenso gewonnen wie unter 2.6. beschrieben, zunachst durch Filtration von den darin vorhandenen Hefen befreit (Filter siehe Liste) und danach sofort bei -20° C eingefroren.

Nach Durchführung der kompletten Versuchsreihe wurden alle Proben bestimmt. Zunächst erfolgte die Herstellung der antimykotischen Standardlösungen. Ketoconazol wurde zu N-N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, D) gegeben (1 ml/10 mg Ketoconazol), um die Auflosung zu erleichtern. Die benotigten Verdünnungen konnten danach mit steriler Aqua destillata gewonnen werden (5, 2, 1 und 0,5 μg/ml). Als Teststamm stand Candida albicans ATCC 28516 zur Verfügung (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien), die wöchentlich auf Sabouraud Dextrose-Schragagar subkultiviert wurde.

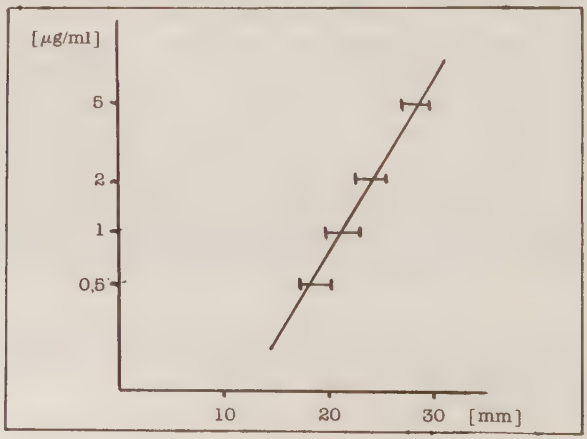
Das Testmedium setzte sich (pro Liter) aus 7 g YNB (Yeast Nitrogen Base; Difco Lab., Detroit, Michigan, USA), 7 g Trypticase Peptone (BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA), 15 g D(+)-Glukose-Monohydrat (Merck, Darmstadt, D) und 15 g Agar (BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA) zusammen und besaß einen pH von 6,0.

Um die Testplatten herzustellen, wurde nun mit Material von einer zwei bis drei Tage alten Sabouraud Dextrose-Schragagar-Kultur eine Suspension im YNB-Bouillon erzeugt und eine Minute lang maschinell gerüttelt.

Dieses Inoculum wurde nun für vier bis sechs Stunden bei 35° C inkubiert und die Dichte danach mit Hilfe eines Photometers (siehe Liste) und sterilem Aqua destillata auf $4 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt.

Vorher abgemessene 25 ml-Mengen des Testmediums wurden erhitzt, auf 48° C abgekuhlt, mit 0,5 ml der eingestellten Keimsuspension beimpft und dann vorsichtig vermischt und in runde, ebenstehende Plastikpetrischalen (135 mm Durchmesser) gegossen. In der Peripherie der Platten wurden nach dem Erharten Locher mit 6 mm Durchmesser aus dem Agar gestanzt, in die jeweils 20 μl der Standardkonzentration oder der zu bestimmenden unbekannten Probe gefullt wurden (jede Standardreihe plus Probe wurde dabei doppelt angelegt).

Abb. 5: Darstellung der Hemmhofdurchmesser von Ketoconazol in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration (Standardgerade)



Die fertigen Platten wurden nun für 20 Stunden bei 37° C inkubiert.

Die danach vorliegenden Hemmzonen wurden sorgfältig gemessen (Ablesung mittels Schublehre auf 0,1 mm Genauigkeit) und die gefundenen Durchmesser der Standardlösungen auf halblogarithmischen Millimeterpapier gegen die Ketoconazolkonzentration aufgetragen, um somit Standardgeraden zur Bestimmung der unbekannten Probe zur Verfügung zu haben (siehe oben Abb. 5).

Da bei diesem Verfahren ein linearer Zusammenhang zwischen Hemmzonendurchmesser und der lg-Konzentration von Ketoconazol nur in dem pharmakologisch relevanten Bereich von 0,5 bis 20 μg/ml gegeben ist, wurden, wie schon erwähnt, nur die Proben der Gesamtkonzentrationen bestimmt, da wie Tabelle 3 zeigt, bei den freien Konzentrationen ein Maximum von 0,02 μg/ml auftritt, was jenseits der Empfindlichkeit dieser Methode liegt.

Tab. 3 Berechnung der aufgrund von Probanden-Daten ermittelten Ketoconazol-Konzentration in Kantharidinblasenflüssigkeit in der Zeit

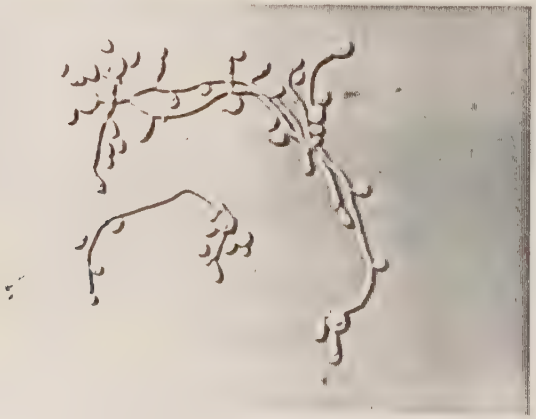
Probennummer	Entnahmezeit der Probe	$t-t_{lag}$	$[e^{-K_0 \cdot (t-t_{lag})} - e^{-K_a \cdot (t-t_{lag})}]$	[ ]·3,80 ≙Gesamtkonz.	[ ]·0,87 ≙freie Konz.
	[min]	[h]		[μg/ml]	[μg/ml]
1	15	—	—	—	—
2	55	0,11	0,0205	0,0779	0,0017
3	95	0,78	0,1222	0,4636	0,0106
4	135	1,45	0,1907	0,7246	0,0165
5	175	2,11	0,2343	0,8903	0,0203
6	215	2,78	0,2604	0,9895	0,0226
7	255	3,45	0,2728	1,0366	0,0237
8	295	4,11	0,2755	1,0469	0,0239
9	335	4,78	0,2712	1,0305	0,0236
10	375	5,45	0,2622	0,9963	0,0228
11	425	6,11	0,2501	0,9503	0,0217
12	475	6,78	0,2358	0,8960	0,0205

2.8. Morphologische Begleituntersuchung

Die Morphologie der sich vermehrenden Keime wurde mikroskopisch am Deckgläschen-bewehrten Objektivträger-Nativpräparat kontrolliert und ggfs. photographisch festgehalten (Interferenzmikroskop, Leitz, Wetzlar, D). Beim synthetischen Aminosäuremedium zeigte sich bei den stündlichen Untersuchungen sehr bald die Entwicklung von Pseudomycelformen (siehe Abb.6 und 7), wie von Lee et al. (37) beschrieben, während im Sabouraud-Glukose-Medium die Hefeformen fast durchweg persistierten.

Abb. 6: Ausbildung von Pseudomycelformen von Candida albicans im synthetischen Aminosäure-Medium nach 120minütiger Ketoconazol-Einwirkung, Objektivvergrößerung 100×

Abb. 7: Ausbildung von Pseudomycelformen von Candida albicans im synthetischen Aminosäure-Medium nach 240minütiger Ketoconazol-Einwirkung, Objektivvergrößerung 40×



3. Ergebnisse

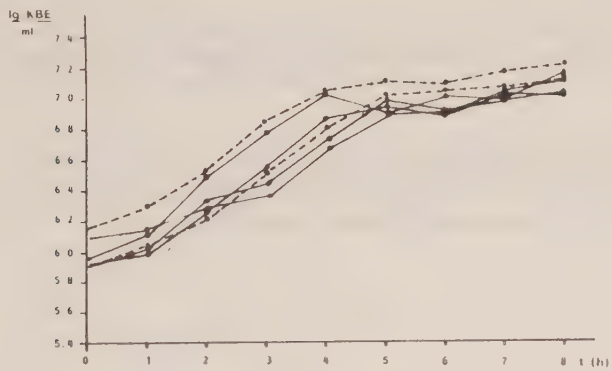
3.1. Wachstum der eingesetzten Hefe in unterschiedlichen Medien

Die vorliegenden Versuchsbedingungen (stete Verdunnung durch zugefuhrte Boullion im zentralen Kulturgefaß A etc) fuhrten zu einer regelmaßig guten Vermehrung der eingesetzten Hefe (Candida albicans Nr 5125/85) in den beiden unterschiedlichen Medien.

Dabei war anders als im Sabouraud-Glukose-Medium in dem synthetischen Aminosaure-Medium stets ein hoher Anteil von Pseudomycelformen nachweisbar (Abb. 6 und 7).

Im Sabouraud-Glukose-Medium kam es wahrend des Untersuchungszeitraumes zu einer Zunahme der Keimdichte auf etwa das 13,4fache, in dem synthetischen Aminosaure-Medium nach Lee et al. (37) auf das 13,8fache (Abb. 8).

Abb. 8: Wachstum von Candida albicans Nr 5125/85 im Modellversuch bei unterschiedlichen Medien (gestrichelte Kurven Sabouraud-Glukose-Medium, durchgezogene Kurven synthetisches Aminosaure-Medium)



3.2. Wachstumshemmung im Sabouraud-Glukose-Medium

Das Profil der freien (nicht eiweißgebundenen) Konzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflussigkeit zeigte im Sabouraud-Glukose Medium nur eine geringe, wenn auch reproduzierbare Wachstumshemmung (Abb. 9)

Bei dieser Versuchsreihe nahm binnen acht Stunden die Keimdichte nur um das 10,2fache (Mittelwert aus den drei Versuchsansatzen) der Inokulumgroße zu Beginn zu

Wurden im gleichen, die Hefeform begunstigenden Medium die entsprechenden Ketoconazol-Gesamtkonzentrationen zu Grunde gelegt, so ließ sich ein merklich starkerer, aber immer noch eher diskreter antimikrobieller Effekt erkennen (Abb. 10).

In Gegenwart dieses Profils zeigte sich eine noch schwächere Zunahme der Keimdichte, hier erreichten die drei Versuchsansätze im Mittel nur das 4,8fache der Inokulumgröße zu Beginn (zum Vergleich: die beiden Ansätze ohne Wirkstoffprofil zeigten innerhalb der Versuchsdauer ein Ansteigen der Keimdichte um das 13,4fache des Ausgangswertes; siehe auch 3.1.).

Abb. 9: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im Sabouraud-Glukose-Medium in Gegenwart des Profils der freien Konzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflüssigkeit (zum Vergleich: die beiden oberen Endpunkte gehören zu den Kurven der Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol)

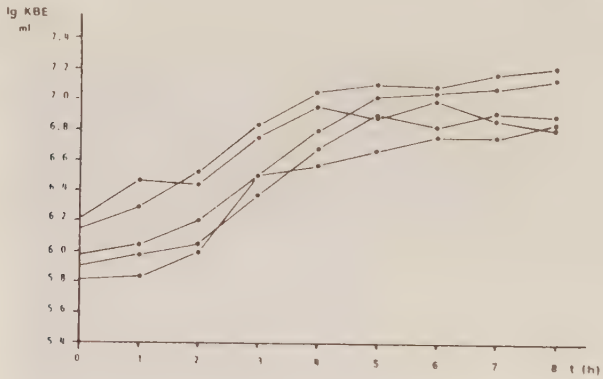
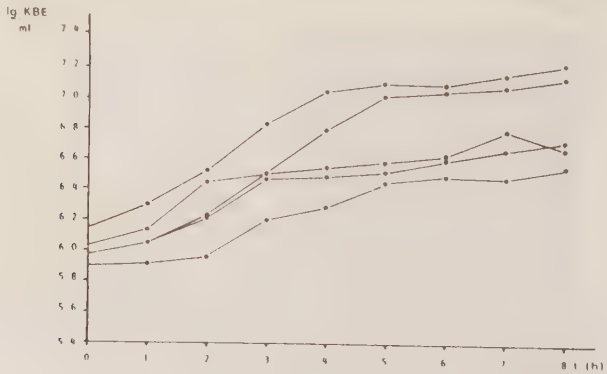


Abb. 10: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im Sabouraud-Glukose-Medium in Gegenwart des Profils der Gesamtkonzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflüssigkeit (zum Vergleich: die beiden oberen Endpunkte gehören zu den Kurven der Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol



3.3. Wachstumshemmung im synthetischen Aminosaure-haltigen Medium

Der Vergleich zwischen den jeweils parallel mitgeführten Kontrollansatzen ohne Wirkstoffprofil und den Versuchsansatzen mit Ketoconazol erbrachte im synthetischen Aminosaure-haltigen Flussigmedium starkere Unterschiede im Hefewachstum als unter 3.2. für das Sabouraud-Glukose-Medium beschrieben.

Dieser Parallel-Versuchsansatz wurde zur Dokumentierung der Reproduzierbarkeit jeweils zweimal durchgefuhrt.

In Gegenwart des Gesamtkonzentrationsprofils nahm die Keimdichte wahrend der Versuchsdauer nur auf das 2,1fache der Ausgangsgroße (Mittelwert aus beiden Versuchen) zu (Abb. 11 und 12).

Wurden im gleichen, die Pseudomycelform begunstigenden Medium das der freien Konzentration von Ketoconazol entsprechende Profil zu Grunde gelegt, so zeigte sich eine ebenfalls deutliche wachstumshemmende Wirkung (Abb. 13 und 14).

Die Gegenwart dieses Profils brachte eine Zunahme der Keimdichte auf das 6,7fache der Ausgangsgroße (Mittelwert aus beiden Versuchen).

Abb. 11. Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im synthetischen Aminosaure-Flussigmedium in Gegenwart des Profils der Gesamtkonzentration von Ketoconazol in Kantharidinblasenflussigkeit (zum Vergleich. Die obere Kurve gibt die Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol wieder; Versuch 1)

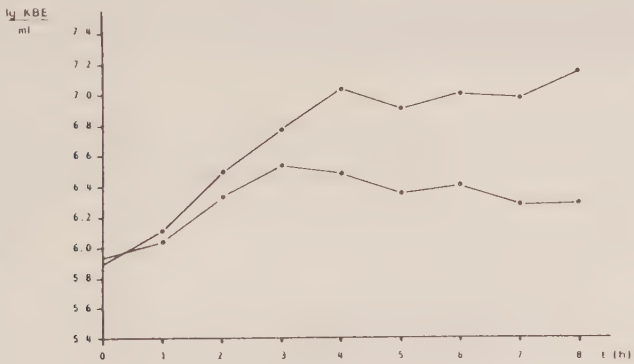


Abb. 12: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im synthetischen Aminosäure Flussigmedium in Gegenwart des Profils der Gesamtkonzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflussigkeit (zum Vergleich: die obere Kurve gibt die Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol wieder; Versuch 2)

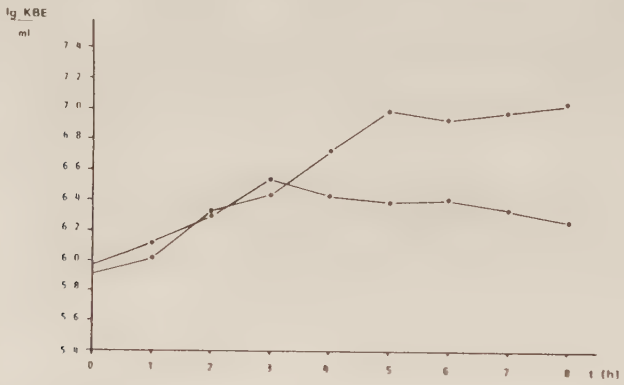


Abb. 13: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im synthetischen Aminosäure-Flussigmedium in Gegenwart des Profils der freien Konzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflussigkeit (zum Vergleich: die obere Kurve gibt die Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol wieder; Versuch 1)

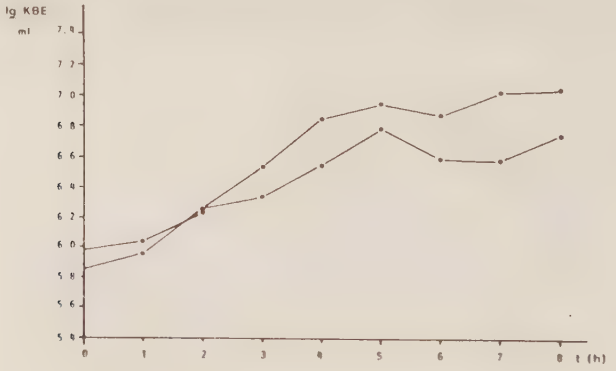
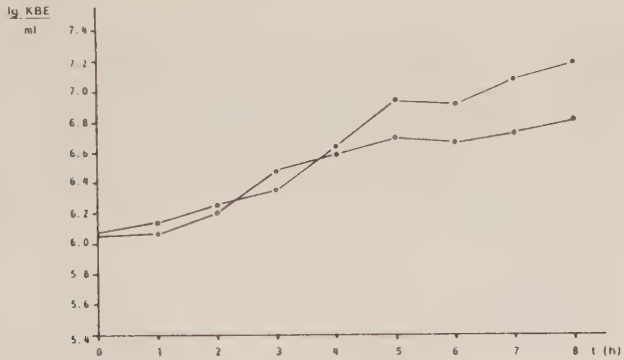


Abb. 14: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im synthetischen Aminosaure-Flussigmedium in Gegenwart des Profils der freien Konzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflussigkeit (zum Vergleich: die obere Kurve gibt die Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol wieder; Versuch 2)



3.4. Tatsachliche Konzentrations-Zeit-Verlaufe

Die Abb. 15 und 16 zeigen die im Kantharidinblasenspiegelsimulationsversuch ermittelten Konzentrationsprofile (siehe 2.7) der Gesamtkonzentration von Ketoconazol mit Sabouraud-Glukose- bzw synthetischen Aminosaure-Medium bei Candida albicans Nr 5125/85.

Um zu verdeutlichen, inwieweit die dynamischen Bedingungen der oben genannten Versuchsreihen das richtige Konzentrations-Zeit-Profil erbracht hatten, zeigt die gestrichelte Kurve den anhand der Probanden-Daten ermittelten wahren Verlauf der Konzentration in der Zeit.

Abb 16: Konzentrations-Zeit-Profile der Gesamtkonzentration von Ketoconazol im Sabouraud-Glukose-Medium (die gestrichelte Kurve gibt den anhand der Probanden-Daten ermittelten wahren Konzentrationsverlauf wieder)

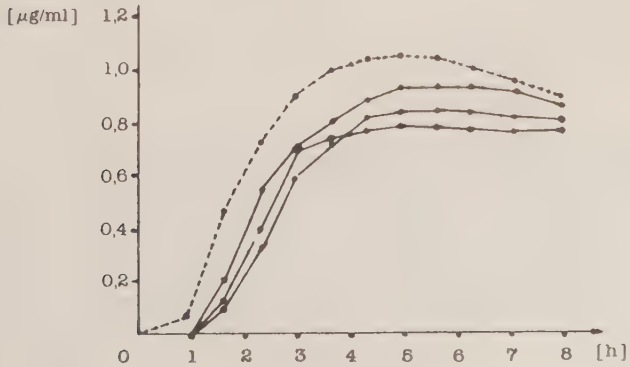
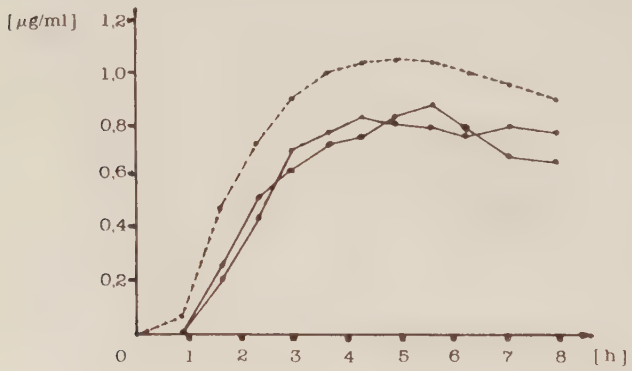


Abb 16: Konzentrations-Zeit-Profile der Gesamtkonzentration von Ketoconazol im synthetischen aminosaurehaltigem Medium (die gestrichelte Kurve gibt den anhand der Probanden-Daten ermittelten wahren Konzentrationsverlauf wieder)



4. Diskussion

4.1. Unterschiedliche Wirksamkeit von Ketoconazol auf Hefe- bzw. Pseudomycelformen

Bereits Borgers et al. (6) hat auf den relativ großen Unterschied in der Wirksamkeit von Azolantimycotika auf die Hefe- bzw. auf die Pseudomycelform von Candida albicans hingewiesen. Dieses Phanomen hat sich durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen in eindrucksvoller Form bestatigt, wahrend sich die dahingehenden Beobachtungen bislang nur auf statische Versuchsansatze (Einwirkung einer konstanten Konzentration in der Zeit) stutzen konnten. Dem Phanomen der deutlich größeren Aktivität von Ketoconazol gegenüber der Pseudomycelform von Candida albicans kommt ja vor allem deshalb ein immer größeres, gerade auch klinisches Interesse zu, weil es sich gezeigt hat, daß mit dem Übergang von der saprophytaren zur parasitaren Daseinsform von Candida albicans eine entsprechende strukturelle Umwandlung einhergeht.

Auch wenn sich in den vorliegenden Untersuchungen Ketoconazol als gerade gegenuber der Pseudomycelform von Candida albicans durchaus wirksam erwiesen hat, so darf darüber nicht vergessen werden, daß bei Antibiotika in Modellversuchen vom vorliegenden Typ in der Regel viel drastischere antimikrobielle Effekte gesehen werden, so führen die Hautblasenflussigkeitspiegel nach einmaliger Gabe von einem Gramm Cefotiam intramuskulär binnen acht Stunden zu einer Reduktion der Gonokokkendichte um ca. 5 Zehnerpotenzen (31).

Hieraus darf wohl der Schluß gezogen werden, daß die therapeutische Sicherheitsmarge in der antimikrobiellen Chemotherapie beim systemischen Einsatz von Antibiotika, etwa des Cephalosporintyps, heute noch hoher ist als beim systemischen Einsatz von Antimykotika vom Azoltyp.

4.2. Verbesserte Aussagekraft uber die klinische Wirksamkeit von Imidazolen aufgrund von In-vitro-Versuchen

Wie bereits aufgezeigt, stellen sich der In-vitro-Aktivitatsbestimmung von Antimykotika – und dies gilt ganz besonders fur Antimykotika der Azolreihe wie Ketoconazol – immer noch erhebliche Probleme gegenuber, und zwar in einem Umfang, wie sie in der klinischen Bakteriologie langst der Vergangenheit angehoren. Und diese Probleme kreisen nicht zuletzt immer noch um den zentralen Punkt jeder In-vitro-Wirksamkeitsbemessung von Chemotherapeutika, nämlich um den pradikativen Wert der erhobenen Daten fur den etwaigen therapeutischen Effekt in der Klinik allgemein wie beim einzelnen Erkrankten.

Bei reinen In-vitro-Untersuchungen ist es – alle anderen Probleme wie das der mangelnden Reproduzierbarkeit einmal ausgeklammert – bislang anscheinend uberhaupt noch nicht gelungen, zuverlässige Hinweise auf mogliche therapeutische Wirkungen zu erlangen. Angesichts dieser Tatsache erscheint es erwagenswert, gerade bei Hefen nicht nur auf den statischen MHK-Begriff allein zu bauen, sondern vielmehr dynamische Gesichtspunkte miteinzubeziehen, wie sie ja gerade die klinische Behandlungssituation pragen. In die klinische Bakteriologie haben derartige Untersuchungen ja bereits in gewissem Umfang Eingang gefunden (31, 32, 72), und es scheint inzwischen moglicherweise gelungen zu sein, aufgrund von In-vitro-Untersuchungen nach Art der vorliegenden, Voraussagen nicht nur über die Wirksamkeit eines antimikrobiellen Chemotherapeutikums in der Klinik an sich, sondern auch über seine erforderliche Mindestdosis zu machen (35).

Die hier für Ketoconazol erhobenen Befunde spiegeln zum einen die gut dokumentierte klinische Wirksamkeit bei lokalisierten Candidosen wider, lassen es aber zum anderen auch als erklärlich erscheinen, daß bei der klinischen Anwendung von Ketoconazol keineswegs so sicher ein Heilerfolg erwartet werden kann (5, 13, 71), wie dies etwa heute bei der Behandlung der Gonorrhoe mit einem Dritt-Generations-Cephalosporin der Fall ist.

Selbstverständlich können die vorliegenden Untersuchungen höchstens die Vermutung zulassen, daß derartige Experimente die Aussagekraft von In-vitro-Untersuchungen zur Wirksamkeit von Antimykotika nicht zuletzt der Azolreihe steigern könnten. Eine wesentliche Bestätigung wäre darin zu erblicken, wenn in zukünftigen Untersuchungen parallel zum klinischen Erfolg oder Mißerfolg der mycozide Effekt des nach Applikation zu verzeichnenden Arzneistoffspiegelprofils gegenüber den einzelnen Erregerisolaten geprüft würde und sich In-vitro-Unterschiede fänden, die mit den unterschiedlichen klinischen Erfolgen korrelierten.

4.3. Unterschiedliche Wirksamkeit von Ketoconazol bei Profilen der freien bzw. Gesamtkonzentration in Kantharidinblasenflüssigkeit

Wenn es in Zukunft potentielle, neue peroral applizierbare Antimykotika zu entwickeln gilt, so sollten in Zukunft einerseits – und dies gilt in Sonderheit, wenn Haut- resp. Schleimhautcandidosen in Betracht kommen – die Konzentrationsverläufe von gebundener wie freier Substanz in der Haut – etwa unter Rückgriff auf die Kantharidinblasenmethode – ermittelt werden und dann andererseits unter Rückgriff auf beide so gewonnenen Profile eine Untersuchung des mycoziden Effekts erfolgen.

Dabei gilt es selbstverständlich wiederum – wie eingangs der Diskussion angesprochen – die Pseudomycelform von Candida albicans ebenso zu berücksichtigen wie die Hefeform.

Die erheblichen Unterschiede im antimikrobiellen Effekt zwischen den Profilen der freien und der Gesamtkonzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflüssigkeit machen deutlich, wie wichtig es dabei ist, im Rahmen von pharmakokinetischen Untersuchungen mit Antimycotika nicht nur die Gesamtkonzentrationen am Infektionsort, sondern auch die freien, d.h. nicht eiweißgebundenen Konzentrationen zu ermitteln, da nach heute überwiegender Auffassung nur sie als tatsächlich wirksam zu erachten sind. Dies aber ist nur bei einem Teil der Methoden zur Untersuchung von Wirkstoffspiegeln in der Haut möglich, vor allem eben nicht zuletzt auch bei Heranziehung der Katharidinblasenmethode.

5. Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Versuchsreihe wurde Candida albicans (Isolat-Nr 5125/85) zum einen in Sabouraud-Glukose-Bouillon, zum anderen in einem Aminosäure-haltigen synthetischen Flüssigmedium den ständig schwankenden Konzentrationen von Ketoconazol ausgesetzt.

Dabei wurden dieser Exponierung die Profile der freien (nicht eiweißgebundenen), sowie die der Gesamtkonzentrationen zu Grunde gelegt, die bei Menschen nach einmaliger peroraler Verabreichung von 200 mg in kutaner Kantharidin-Blasenflüssigkeit gefunden wurden.

Zu jedem Versuchsansatz mit Ketoconazol wurde zu Vergleichszwecken jeweils eine identische Versuchsanordnung ohne Wirkstoff parallel mitgeführt.

Ohne Wirkstoff zeigte die eingesetzte Hefe in beiden Medien ein fast gleich starkes Wachstum (Zunahme der Keimdichte während des Untersuchungszeitraumes auf das 13,4 bzw. 13,8fache).

Bei den Versuchen mit dynamischen Wirkstoffprofilen fand sich bei der Verwendung des ersteren, die Hefeform begünstigenden Mediums nur eine relativ geringe Wachstumshemmung. In dem die Pseudomycelform begünstigenden synthetischen Aminosäure-Medium war demgegenüber – konzentrationsabhängig – ein deutlicher antimikrobieller Effekt zu erkennen (Keimdichtenzunahme in Gegenwart der Gesamtkonzentration auf das 2,1fache, im Kontrollversuch auf das 15,3fache).

Die Ergebnisse bestätigen eindrucksvoll die größere Wirksamkeit von Ketoconazol auf die Pseudomycelform von Candida albicans, zugleich wird die geringere Sicherheitsmarge bei der systemischen Behandlung mit Azolen gegenüber der antimikrobiellen Chemotherapie mit Antibiotika deutlich.

Untersuchungsreihen vom vorliegenden dynamischen Typ - wie in der klinischen Bakteriologie schon häufiger durchgeführt – könnten auch bei der In-vitro-Wirksamkeitsprüfung neuer Antimycotika zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Zusammensetzung des synthetischen Aminosäuremediums nach Lee et al.

Tab. 2: Versuchsrelevante Pharmakokinetikdaten und daraus abgeleitete experimentielle Größen

Tab 3: Berechnung der aufgrund von Probanden-Daten ermittelten Ketoconazolkonzentration in Kantharidinblasenflüssigkeit in der Zeit

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Strukturformel von Ketoconazol

Abb. 2: Morphologie von Candida albicans auf Reisagar (Chlamydosporenbildung), Schemazeichnung

Abb. 3. Ketoconazol-Konzentration (Mittelwert ± mittlere Standardabweichung) in Kantharidinblasenflüssigkeit beim Menschen

Abb. 4: Schema des Versuchaufbaus zur Untersuchung des antimikrobiellen Effekts von standig schwankenden Ketoconazolkonzentrationen auf Candida albicans

Abb. 5: Darstellung der Hemmhofdurchmesser von Ketoconazol in Abhangigkeit von der Wirkstoffkonzentration (Standardgerade)

Abb. 6: Ausbildung von Pseudomyzelformen von Candida albicans im synthetischen Aminosauremedium nach 120minütiger Ketoconazoleinwirkung, Objektivvergroßerung 100x

Abb. 7: Ausbildung von Pseudomyzelformen von Candida albicans im synthetischen Aminosäuremedium nach 240minütiger Ketoconazoleinwirkung, Objektivvergroßerung 40x

Abb. 8: Wachstum von Candida albicans Nr. 5125/85 im Modellversuch bei unterschiedlichen Medien (gestrichelte Kurven: Sabouraud-Glucose-Medium, durchgezogene Kurven: synthetisches Aminosaure-Medium)

Abb. 9: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans in Sabouraud-Glukose-Medium in Gegenwart des Profils der freien Konzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflüssigkeit (zum Vergleich: Die beiden oberen Endpunkte gehören zu den Kurven der Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol).

Abb. 10: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im Sabouraud-Glukose-Medium in Gegenwart des Profils der Gesamtkonzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflussigkeit (zum Vergleich: Die beiden oberen Endpunkte gehören zu den Kurven der Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol).

Abb. 11: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im synthetischen Aminosaure-Flüssigmedium in Gegenwart des Profils der Gesamtkonzentration von Ketoconazol in Kantharidinblasenflüssigkeit (zum Vergleich: Die obere Kurve gibt die Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol wieder; Versuch 1)

Abb. 12: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im synthetischen Aminosäure-Flussigmedium in Gegenwart des Profils der Gesamtkonzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflüssigkeit (zum Vergleich: Die obere Kurve gibt die Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol wieder; Versuch 2)

Abb. 13: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im synthetischen Aminosäure-Flussigmedium in Gegenwart des Profils der freien Konzentrationen von Ketoconazol in Kantharidinblasenflüssigkeit (zum Vergleich: Die obere Kurve gibt die Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol wieder; Versuch 1)

Abb. 14: Entwicklung der Keimdichte von Candida albicans im synthetischen Aminosäure-Flüssigmedium in Gegenwart des Profils der freien Konzentration von Ketoconazol in Kantharidinblasenflüssigkeit (zum Vergleich: Die obere Kurve gibt die Keimdichte in Abwesenheit von Ketoconazol wieder; Versuch 2)

Abb. 15: Konzentrations-Zeit-Profile der Gesamtkonzentration von Ketoconazol im Sabouraud-Glukose-Medium (die gestrichelte Kurve gibt den anhand der Probanden-Daten ermittelten wahren Konzentrationszeitverlauf wieder)

Abb. 16: Konzentrations-Zeit-Profile der Gesamtkonzentration von Ketoconazol in Aminosäure-haltigen Flüssigmedium (die gestrichelte Kurve gibt den anhand der Probanden-Daten ermittelten wahren Konzentrationszeitverlauf wieder)

6. Literaturverzeichnis

1. Ansehn, S., Nilsson L: Direct membrane-damaging effect of ketoconazole and tioconazole on Candida albicans demonstrated by bioluminescent assay of ATP. Antimicrob. Ag. Chemother. 26:22-25, (1984).

2. Ball,E.H., Forbes EC, Gentles JC: Unusual response of a yeast to imidazole antifungals. Sabouraudia 19:287-294, (1981).

3. Bishop, M.P.J.M, Merkus, J.M.W.M., Scheyground, H., Van Cutsem, J. and Van de Kuy, A.: Treatment of vaginal candidiasis with ketoconazole, a new orally active antimycotic. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 9:253-259, (1979)

4 Bodet III, C.A., Jorgensen, J.H. and Drutz, D.J.: Simplified Bioassay Method for Measurement of Flucytosine or Ketoconazole. J. Clin. Microbiol. 22:157-160, (1985).

5. Borelli, D., Fuentes, J., Leiderman, E., Restrepo-M., A., Brau, J.L., Legendre, R., Levine, H.B., and Stevens, D.A.: Ketoconazole, an oral antifungal. Laboratory and clinical assessment of imidazole drugs. Postgrad. Med. J. 55:657-661, (1979).

6. Borgers, M., De Brabander M., Van den Bossche, H.: Differential effects of imidazole anti-fungal drugs on the yeast and mycelial phases of Candida albicans in vitro. Proceedings of the Royal Society Medicine, Intern. Congress a. Symposium, Series Number 7: 21-23, (1979).

7. Borgers, M.: Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. Review of Infections Diseases 2: 520-534, (1980).

8. Bowman, P.J. & Ahearn, D.G.: Evaluation of the Uni-Yeast-Tek Kit for the identification of medically important yeasts. J.Clin.Microbiol. 2, 354- 358, (1975).

9. Bowman, P.J. & Ahearn, D.G.: Evaluation of commercial systems for the identification of clinical yeast isolates. J. Clin. Microbiol. 4, 49-53, (1976).

10 Brass, C.: Shainhouse, J.Z. and Stevens, D.A.: Variability of agar dilution-replicator method of yeast suspectibility testing. Antimicrob. Ag. Chemother. 15: 763-768, (1979).

11. Brunner, G.: Struktur der Zellmembran. Biologie in unserer Zeit. 8:65- 74, (1978).

12. Casals, J.B.: Tablet testing of pathogenetic fungi. J.Clin.Pathol.32:719-722, (1979).

13. Creatsas, G., Zissis, N.P and Lolis, D: Ketoconazole, a new antifungal agent, in vaginal candidiasis. Current Therapeutic Research 28:121-126, (1980).

14. De Nollin, S. and Borgers, M.: Scanning electron microscopy of Candida albicans after in vitro treatment with miconazole. Antimicrob. Ag. Chemother. 7:704-711, (1975).

15. De Nollins, S. and Borgers, M.: An ultrastructural and cytochemical study of Candida albicans after the in vitro treatment with imidazoles. Mykosen 19:317-328, (1976).

16. Duncan, J. & Floeder, J.: A comparison of media for the production of chlamydospores by Candida albicans. Am.J.Med.Technol.29:199-206, (1963).

17. Fromtling R.A., YU, H-P, Shadomy, S: In vitro antifungal activities of Bay n7133 and Bay L 9139, two new orally absorbed antifungal imidazole derivatives, against pathogenic yeasts. Mycopathologia 86:45-50, (1984).

18. Galgiani, J.N. and Stevens, D.A.: Antimicrobial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size. Antimicrob.Ag.Chemother.10:721-726, (1976).

19. Godefroi, E.G., Heeres, J., Von Cutsem, J.H. and Janseen, P.A.J.: The preparation and antimycotic properties of derivatives of 1-phenyl- ethylimidazole. Journal of Medical Chemistry 12:784-791, (1969).

20. Grasso, S., Meinardi, G., De Carneri, J., Tamassia, V.: New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrob. Ag. Chemother. 13:570-576, (1978).

21. Grendahl, J.G. and Sung, J.P.: Quantitation of Imidazoles by agar-disk diffusion. Antimicrob. Ag. Chemother. 14:509-513, (1978).

22 Hattingberg, von, H.M., Brockmeier D., Kreuter G. A rotating iterative procedure (RIP) for estimating hybrid constants in multicompartment analysis on desk computers. Eur. J. Clin. Pharmakol. 11:381, (1977).

23 Heel, R.C.: Ketoconazole A review of its therapeutic afficacy in superficial and systemic fungal infections. Drugs 23:1-36, (1982).

24. Heeres, J., Backx, L.J.J., Mostmaus, J.H. and Van Cutsen, J: Antimycotic imidazoles. Part 4. Synthesis and antifungal activity of Ketoconazole, a new potent orally active broad-sprectrum antifungal agent. Journal of Medicinal Chemistry 22:1003-1005, (1979)

25 Herrling, S., Sous, H., Kruppe, E., Osterloh, G. and Muckter, H.: Experimentelle Untersuchungen uber eine neue gegen Pilze wirksame Verbindung. Arzneimittel-Forschung 9:489-494, (1959).

26. Holbrook, W.P. and Kippax, R.: Sensivity of Candida albicans from patients with chronic oral candidiasis. Postgrad. Med. J. 55:692- 694, (1979).

27. Jerchel, D., Fischer, H., and Kracht, M.: Zur Darstellung der Benzimidazole. Liebigs Annalen der Chemie 575:162-173, (1952).

28 Johnson E.M., Richardson M.D. & Warnok D.W.: Effect of imidazole antifungals on the development of germ tubes by strains of Candida albicans. J. Antimicrob. Chemother 12:303-316, (1983).

29 Jorgensen, J.H., Alexander, G.A., Graybill, J.R. und Drutz, D.J.: Sensitive Bioassay for Ketoconazole in Serum and Cerebrospinal Fluid. Antimicrob. Ag. Chemother. 20:59-62, (1981).

30. Johnson E.M., Richardson, M.D., Warnock, D.W.: In-vitro restistance to imidazole antifungals in Candida albicans. J. Antimicrob. Chemother. 13:547- 558, (1984).

31. Korting, H.C., Niederauer, H., Ollert, M.. Bactericidad activity of Cefotiam and Ceftizoxime with Neisseria gonorrhoeae in an in vitro Model Simulating Plasma and Cantharidal Blister Fluid Levels after the Single Intramuscular Applications of One Gram. Chemotherapy 32:260-269, (1986).

32. Korting, H.C., Maier, W., Schafer-Korting, M.: In-vitro-Bakterzidieeffekte der Plasma- und Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegelprofile von Ofloxacin nach einmaliger peroraler Gabe von 600 mg bei Staphylococcus aureus – Hautisolaten. Zbl. Bakt. Hyg. A: submitted for publication, (1986).

33. Korting, H.C., Maier, W., Schafer-Korting, M.: Zur Keimreduktion bei Streptococcus pyogenes – Hautisolaten durch Ofloxacin. In-vitro- Bakterzidieeffekte der Plasma- u. Kantharidinblasenflussigkeitsspiegelprofile nach einmaliger peroraler Gabe von 600 mg beim Menschen. ZAC. in press, (1987).

34. Korting, H.C., Dorsch, R.: Zur Korrelation von Biotyp und Antimykotikaempfindlichkeit bei Candida Albicans. Untersuchungen mit dem Agardilutions- bzw. Mikrodilutionstest.Mykosen. Submitted for publication, (1986).

35. Korting, H.C., Ollert, M., Lukacs, A., Schäfer-Korting, M.: Can the clinical efficacy of different antibiotic dosage regimes in gonorhoeae be predicted from the gonocidal effect of the corresponding plasma level profiles simulated in vitro? Acta dermato.-venereol. in press, (1986).

36 Krempl-Lamprecht, L.: Problematik der In-vitro Aktivitatsbestimmungen bei Pilzen. Orale Mykosen-Therapie. 2. Deutsches Nizoral-Symposium. Hauck- Seeliger-Adam; Urban & Schwarzenberg, (1984).

37. Lee, K.L., Buckley, H.R. and Campbell, C.C.: An Amino Acid Liquid Synthetic Medium for the Development of Mycelial and Yeast Forms of Candida Albicans. Sabouraudia 13:148-153, (1975).

38. Lefler, E. and Stevens, D.A.: New azole compounds: vibunazole (Bay n7133) and Bay 19139, compared with ketoconazole in the therapy of systemic candidosis and in pharmakokinetic studies, in mice: J. Antimicrob. Chemother. 15:69-75, (1985).

39. Lodish, H.F. and Rothman, J.E.: The assembly of cell membranes. Scientific American 240:38-53, (1979).

40. Marriott, M.S.: Inhibition of sterol biosynthesis in Candida albicans by imidazole containing antifungals. J. Gen. Microbiol. 117:253-255, (1980).

41. Minagawa, H., Kitaura, K., Nakamizo, H.,: Effects of pH on the activity of ketoconazole against Candida albicans. Antimicrob Ag. Chemother. 23:105- 107, (1983).

42. Moody, M.R.:, Young, V.M., Morris, M.J. and Schrimpff, S.C.: In vitro activities of miconazole, miconazole nitrate, and ketoconazole alone and combined with refampin against Candida spp. and Torulopsis glabrata recovered from cancer patients. Antimicrob. Ag. Chemother. 17:871-875, (1980).

43. Muerkoester, G.C., Komorowski, R.A., Farmer, S.G.: A Comparison of Hyphal Growth of Candida albicans in Six Liquid Media. Sabouraudia 17:55-64, (1979).

44 Nes, W.R., Sekula, B.C., Nes, W.D. and Adler, J.H.: The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. Journal of Biological Chemistry 253:6218-6225, (1978).

45. Niimi, M.: Kamiyana, A., Tokunaga, M., Tokunaga, J. and Nakayama, H.: Germ tube-forming cells of Candida albicans are more suspectible to clotrimazole-induced killing than yeast cells. Sabourandia 23:63-68, (1985).

46. Odds, F.C.: Laboratory evaluation of antifungal agents: A comparative study of five imidazole derivatives of clinical importance. J. Antimicrob. Chemother. 6:749-761, (1980).

47. Odds, F.C.: Milne, L.J.R., Gentles, J.C. and Ball, E.H.: The activity in vitro and in vivo of a new imidazole antifungal, Ketoconazole. J. Anatimicrob. Chemother. 6, 97–104, (1980).

48. Odds, F.C.: Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole and miconazole against pathogenetic fungi in vitro. Antimicrob. Ag. Chemother. 22:763-770, (1982).

49. Odds, F.C., Abbott, A.B.: Relative inhibition factors – a novel approach to the assessment of antifungal antibiotics in vitro. J. Antimicrob. Chemother. 13:31-43, (1984).

50. Odds, F.C.: Laboratory Tests for the Activity of Imidazole and Triazole Antifungal Agents in Vitro. Seminars in Dermatology.Vol.4, Number 3, (1985).

51. Plempel. M.: Pharmakokinetik der Imidazol-Antimykotika. Mykosen 23:16- 27, (1980).

52 Plempel, M.: Versuche zur Korrelation von In-vitro- und In-vivo Wirkungen bei Azol-Antimykotika. Mykosen 27:7-13, (1984).

53 Polak, A., Odds, F.C., Ludin, E., Scholer, H.J.: Correlation of Susceptibility Test Results in vitro with Response in vivo: Ketoconazole Therapy in a Systemic Candidiasis Model. Chemotherapy 31.395-404, (1985).

54. Preusser, H.J. und Rostek, H.: Der Einfluß von Nährmedium und Sauerstoff-Partialdruck auf Wachstum, Morphologie und Cytologie von Candida albicans in vitro. Mykosen 26:501-512, (1983).

55. Pye, G.W., Marriott, M.S.: Inhibition of sterol C14 demethylation by imidazole – containing antifungals. Sabouraudia 20:325-329, (1982).

56 Rowe, E L and Morozowich, W . A simple dilution analog computer for simulation of drug distribution processes. J.Pharm. Sci. 58:1375-1378, (1969).

57 Rumler, W. und Heins, S.: Konzentrations-Kontaktzeit – Beziehungen bei der Wirkung von Clotrimazol auf Candida albicans. Mykosen 26:293-297, (1983).

58 Rumler, W., Heins, S. und Heins, J.: Beziehungen zwischen Antimykotikum- Konzentration und Kontaktzeit bei der Wirkung von 5-Fluorzytosin, Bifonazol und Bay N7133 auf Candida albicans. Mykosen 27:436-442, (1984).

59. Ryley, J.F., Wilson, R.G., Barrett-Bee, K.J.: Azole restistance in Candida albicans. Sabouraudia 22:53-63, (1984).

60. Saubolle, M.A., Hoeprich, P.D.: Disk agar diffusion susceptibility testing of yeasts. Antimicrob. Ag. Chemother. 14:517-530, (1978).

61. Schafer-Korting, M., Korting, H.C., Dorn, M., Mutschler, E.: Ketoconazole concentrations in human skin blister fluid and plasma. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 22:371-374, (1984).

62. Sobel, J.D., Muller, G.: Comparison of itraconazole and ketoconazole in the treatment of experimental candidal vaginitis. Antimicrob. Ag. Chemother. 26:266-267, (1984).

63. Sud, I.J., Feingold D.S.: Heterogenity of action mechanisms among antimycotic imidazoles. Antimicrob. Ag. Chemother. 20:71-74, (1981).

64. Sud, I.J., Feingold, D.S.: Mechanisms of action of the antimycotic imidazoles. J. Invest. Dermatol. 76:438-441, (1981).

65. Symoens, J., Moens, M., Scheyground, H., Dony, J., Schuermans, V., Legendre, R. and Finistine, N.: An evaluation of two years of clinical experience with Ketoconazole. Review of Infections Diseases 2: 674-687, (1980).

66. Thienpont, D., Van Cutsem, J. and Borgers, M.: Ketoconazole in experimental candidosis. Review of Infections Diseases 2:570-577, (1980).

67. Uno, J., Shigematsu, M.L., Arai, T.: Primary site of action of Ketokonazole on Candida albicans. Antimicrob. Ag. Chemother. 21:912-918, (1982).

68 Van Cutsem, J., Borgers, M. and De Brabander, M.: The activity of Ketoconazole on Clinical Isolates of Candida Albicans Cultured in a Mycelium Promoting Medium. Mykosen 24:596-602, (1982).

69. Van den Bussche, H., Villemsens, G., Coolks, W., Cornelissen, F., Lauwers, W.F. and Van Cutsem, J.M.: Effects of the antimycotic drug, Ketoconazole, on sterol synthesis. An in vitro and in vivo study. Antimicrob. Ag. Chemother. 17:922-928, (1980).

70. Warwood, N.M. and Blazevic, D.J.: Comparison of cream of rice agar and horse serum for differentiating germ tubes of Candida albicans from filaments of Candida tropicalis. J. Clin. Microbiol. 6:501-502, (1977)

71 Welsh, O. and Rodriguez, M.: Treatment of dermatomycosis with Ketoconazole Review of Infection Diseases 2:582-585, (1980).

72. Wiedemann, B., Seeberg. A.H.: The activity of Cefotiam on Betalactamase -- producing Bacteria in an in vitro model. J. Antimicrob. Chemother. 13:111- 119, 1984.

73. Wolley, D.W.: Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. Journal of Biological Chemistry 152:225-232, (1944).

74. Yamane, I. and Tamioka, F : The concomitant effect of unsaturated fatty acid supplemented to medium on cellular growth and membrane fluidity of cultured cells. Cell Biology International Reports 3:515-523, (1979).

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco danke ich für die Überlassung des vorliegenden Themas und für die Möglichkeit, die damit verbundenen Untersuchungen an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen zu dürfen.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. med. H.C. Korting, der mir als Tutor stets geholfen hat, die während der Arbeit aufgetretenen Schwierigkeiten zu meistern.

Weiters danke ich Frau Dr. Schäfer-Korting vom Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt, für die eingehende Diskussion pharmakokinetischer Aspekte.

Schließlich danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen des Bakteriologischen und Mykologischen Labors für ihre Mithilfe bei technischen Fragen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

8. Lebenslauf

Am 8.12.1952 wurde ich als erstes Kind des Zahnarztes Hans Schlaf und seiner Ehefrau Agnes Schlaf, geborene Winzl, in Tittmoning geboren.

Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Volksschule Tittmoning, von 1963 bis 1967 das Aventinus-Gymnasium in Burghausen, von 1967 bis 1973 das St.Ursula- Gymnasium in Lenggries, wo ich 1973 das Abitur abgelegt habe.

Am 1. Mai 1974 begann ich eine Lehre als Zahntechnikerin, die ich im September 1977 mit der Gesellenprüfung beendete.

Von Oktober 1977 bis September 1979 arbeitete ich im Praxislabor meines Vaters.

Ab Wintersemester 1979 studierte ich Zahnheilkunde an der Ludwig- Maximilians-Universität in München. Im Sommer 1980 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Frühjahr 1982 die zahnärztliche Vorprüfung. Nach dem 10. Semester beendete ich im Sommer 1984 das Studium mit dem Staatsexamen.

Meine Approbation erhielt ich im Januar 1985.

Vom 14.1.1985 bis 31.6.1985 war ich als Ausbildungsassistentin bei Herrn ZA D. Hendl in München beschäftigt. Seit 1.7.1985 bin ich in der väterlichen Praxis in Tittmoning tätig.

Am 14.9.1985 habe ich mit Herrn Wilhelm Maier die Ehe geschlossen.

Die meiner Promotionsarbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen begann ich am 1.10.1985 an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Am 20.2.1986 wurde unser erstes Kind Moritz Sebastian geboren.